

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

# PATENTSCHRIFT

DD (11) 279 486 A1

5(1) C 08 B 5/00  
C 08 B 31/08  
C 08 B 37/02  
C 08 F 8/14  
C 08 G 65/48  
C 08 J 7/12

PATENTAMT der DDR

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 08 B / 287 730 7

(22) 10.03.88

(44) 08.08.90

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD

(72) Büttner, Werner, Dr. rer. nat.; Boeden, Hans-Friedrich, Dr. rer. nat.; Büttner, Dorothea; Rupprich, Christian, Dipl.-Ing.; Becker, Manfred, Dr. rer. nat., DD

(54) Verfahren zur Aktivierung von hydroxylgruppenhaltigen polymeren Verbindungen

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aktivierung von hydroxylgruppenhaltigen polymeren Verbindungen und daraus gebildeten Festkörperoberflächen. Ziel ist es, symmetrische Kohlensäureester zur Aktivierung zu verwenden und deren Einsatzmengen gering zu halten. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die Reaktivität symmetrischer Kohlensäureester gegenüber hydroxylgruppenhaltigen Polymeren stark zu erhöhen. Die Lösung der Aufgabe erfolgt im wesentlichen durch den Zusatz suprernucleophiler Amine. Anwendungsgebiet sind die Biotechnologie, die chemische und pharmazeutische Industrie und die klinische Analytik.

ISSN 0433-6461

12 Seiten

**Erlfindungsanspruch:**

1. Verfahren zur Aktivierung von hydroxylgruppenhaltigen polymeren Verbindungen und daraus gebildeten Festkörperoberflächen, dadurch gekennzeichnet, daß das symmetrische Kohlensäurediester der allgemeinen Formel  $RO-CO-OR$  oder Chlorameisensäureester der allgemeinen Formel  $Cl-CO-OR$ , wobei der Rest  $R$  eine elektronenanziehende Gruppe darstellt, gegebenenfalls Phosgen gemeinsam mit einem Phenol oder einem N-substituierten Hydroxylamin, in Gegenwart von zur Bildung von reaktiven Acyllumsalzen befähigen supernucleophilen Aminen im Verhältnis von 0,01 bis 2,5 Mol Amin pro Mol Kohlensäurediester und gegebenenfalls einem weiteren der Gruppe starker Basen zugehörenden tertiären Amin im Verhältnis 0,1 bis 2,5 Mol Amin pro Mol Kohlensäurediester in wasserfreien organischen Lösungsmitteln bei Temperaturen von 0 bis 100°C mit den hydroxylgruppenhaltigen Polymeren bzw. den daraus gebildeten Festkörperoberflächen umgesetzt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die symmetrischen Kohlensäurediester mit hydroxylgruppenhaltigen Polymeren oder daraus gebildeten Festkörperoberflächen in Gegenwart von supernucleophilen Aminen und gegebenenfalls weiteren tertiären Aminen umgesetzt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Chlorameisensäureester mit hydroxylgruppenhaltigen Polymeren oder daraus gebildeten Festkörperoberflächen in Gegenwart von tertiären carbonatbildenden Aminen und/oder supernucleophilen Aminen zur Reaktion gebracht werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der für die Polymeraktivierung eingesetzte Chlorameisensäureester in Gegenwart des Polymers aus Phosgen und einem substituierten Phenol oder N-substituiertem Hydroxylamin intermediär gebildet und ohne Isolierung mit dem Polymer zur Reaktion gebracht wird und tertiäre carbonatbildende Amine und/oder supernucleophile Amine als Reaktanden eingesetzt werden.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als supernucleophile Amine Verbindungen wie 4-Dimethylaminopyridin (DMAP), 4-Pyrrolidinopyridin (PPY), N-Methylimidazol, Diazabicyclo[5.4.0]undecen (DBU), 4-Morpholinopyridin, Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO) eingesetzt werden.
6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß tertiäre Amine wie Triethylamin, N-Methylmorpholin, N,N-Dimethylanilin oder andere heterocyclische Amine wie Pyridin, Picoline, N-Methylpiperidin, bzw. supernucleophile Amine nach Anspruch 7 eingesetzt werden.
7. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 5 und 6, dadurch gekennzeichnet, daß pro Mol symmetrischer Kohlensäurediester 0,01 bis 2,5 Mol, vorzugsweise 0,2 bis 1,2 Mol supernucleophiles Amin und gegebenenfalls 0,1 bis 2,5 Mol tertiäres Amin (bevorzugt 0,8 bis 1,5 Mol) eingesetzt werden.
8. Verfahren nach Anspruch 1, 3, 5 und 6, dadurch gekennzeichnet, daß pro Mol Chlorameisensäureester 0,1 bis 2,5 Mol, vorzugsweise 0,8 bis 1,5 Mol carbonatbildendes Amin und/oder 0,02 bis 0,5 Mol, vorzugsweise 0,1 bis 0,5 Mol supernucleophiles Amin verwendet werden.
9. Verfahren nach Anspruch 1, 4, 5 und 6, dadurch gekennzeichnet, daß bei einem Verhältnis von Phosgen zu Phenol bzw. N-substituiertem Hydroxylamin von 1,0 zu 0,5 bis 2,0 ein Einsatz von carbonatbildenden tertiären Aminen von 1,0 bis 2,5 Mol pro Mol Phosgen und/oder 0,02 bis 2,5 Mol supernucleophiles Amin pro Mol Phosgen erfolgt.
10. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß in den zur Anwendung kommenden symmetrischen Kohlensäurediestern, Chlorameisensäureestern und Phenolen bzw. N-substituierten Hydroxylaminen der Rest  $R$  eins Succinimidyl-, Phthalimidyl-, 5-Norbornen-2,3-dicarboximidyl-, p-Nitrophenyl- und andere substituierte Phenylreste bedeuten kann.
11. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Temperatur bei der Zugabe der Lösungen der Kohlensäurediester, Chlorameisensäureester bzw. des Phosgens und der anschließenden Reaktion zwischen 0 und 100°C, vorzugsweise 4 bis 60°C gehalten wird und der Umsatz nach 10 bis 120 Minuten abgeschlossen ist.
12. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß als Lösungsmittel polare organische Verbindungen wie Acetonitril, Dimethylsulfoxid, Tetrahydrofuran, Aceton, Dioxan u. a. oder unpolare Verbindungen wie Benzen, Toluol u. a. oder halogenisierte Kohlenwasserstoffe wie Chloroform, Methylenechlorid u. a. bzw. Gemische dieser Lösungsmittel eingesetzt werden.

### Anwendungsgebiet der Erfindung

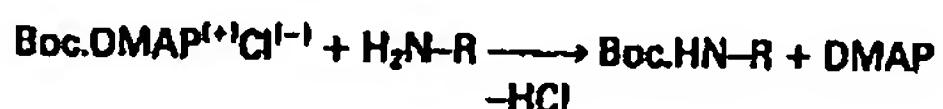
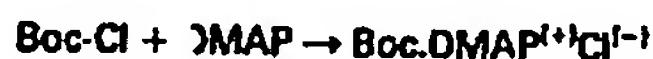
Die Erfindung betrifft die Aktivierung von hydroxylgruppenhaltigen polymeren Verbindungen und daraus gebildeten Festkörperoberflächen, deren Umsetzung mit nucleophilen Komponenten wie Aminen oder SH-gruppenhaltigen Verbindungen zu N-substituierten Carbonaten bzw. Thiokohlensäure-O,S-diester führt. Anwendungsgebiete sind die Biotechnologie, die chemische und pharmazeutische Industrie sowie die wissenschaftliche Untersuchung von Grundlagen und die Verfahrensentwicklung in diesen Industriezweigen und darüber hinaus die klinische Analytik.

### Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Für die Aktivierung hydroxylgruppenhaltiger Matrices sind sehr viele Möglichkeiten beschrieben worden (P. D. G. Dean, W. S. Johnson, F. A. Middle, *Affinity Chromatography*, JRL Press, Oxford, 1985; W. H. Scouten, *Affinity Chromatography*, John Wiley & Sons, New York, 1981). Nur wenige Methoden haben eine breite Anwendung gefunden. Die bisher dominierende Aktivierung mittels Bromcyan wird mehr und mehr durch moderne Methoden ersetzt, die die Nachteile (hohe Toxizität des BrCN, hohe Hydrolyseempfindlichkeit des aktivierte Trägers, geringe chemische Stabilität der durch Kopplung von NH<sub>2</sub>-gruppenhaltigen Liganden entstehenden Isocyanatderivate und deren unerwünschte positive elektrische Ladung im physiologischen pH-Bereich (kPa ~ 9,5)) der Bromcyanaktivierung teilweise oder ganz vermeiden. Charakteristisch für moderne Aktivierungsmethoden ist das Erreichen hoher Kopplungskapazitäten der Träger ohne Beeinträchtigung der strukturellen Eigenschaften (Porosität, mechanische Stabilität, Quellverhalten, Gelbildungseigenschaften, Löslichkeit usw.). Wesentlich ist weiterhin eine gute Lagerstabilität der Träger bei gleichzeitig hoher Reaktivität der aktiven Gruppen (pH-Werte von 7,0–9,0, Raumtemperatur) gegenüber den zu bindenden nucleophilen Liganden. Die entstehende kovalente Bindung zwischen Matrix und Ligand soll chemisch sehr stabil sein, um unter den Bedingungen der praktischen Anwendung eine vernachlässigbar geringe Abspaltung der Liganden von der Matrix zu erhalten. Diesen Anforderungen entsprechen in einigen Punkten die durch Umsetzung mit epoxigruppenhaltigen Verbindungen oder Carbonyldiimidazol erhältlichen – auch kommerziell verfügbaren – aktivierte Trägermaterialien auf der Basis von Sepharose, modifizierten Kieselgelen, Acrylsäuremischpolymeraten, wie Epoxisepharose (Pharmacia), Reacti-Gel (Pierce), Eupergit (Röhm) und epoxiaktiviertes Kieselgel (Merck). Die derzeit besten Ergebnisse werden jedoch durch die Aktivierung hydroxylgruppenhaltiger Träger mit Chlorameisensäureestern erzielt, wobei in die hydroxylgruppenhaltige Matrix sehr reaktive Oxycarbonylgruppen unter Bildung unsymmetrischer Carbonate (Kohlensäureester) eingeführt werden.



J. Drobnič et al. (Biotechnol. Bioeng. 24 (1982) 487) setzten Cellulose und Spheron mit N-Hydroxysuccinimidyl-, Trichlorphenyl- und p-Nitrophenoxychlorameisensäureester in Dioxan als Lösungsmittel bei Temperaturen von 25 bis 65°C um und erreichten Kopplungskapazitäten bis zu 2 mMol/Gramm Cellulose. Ähnliche Ergebnisse erzielte Wilchek und Miron (Biochem. Internat. 4 (1982) 629) an Sepharose und Cellulose bei Umsetzung der Träger in Pyridin bei 4°C. Bei der Reaktion eines neuen Chlorameisensäureesters – N-(Chlorcarbonyloxy)-5-norbornen-2,3-dicarboximid – werden mit hydroxylgruppenhaltigen Polymeren hohe Kopplungskapazitäten bis zu 1 bzw. 1,2 mMol/g Träger für Pericellulose und Sepharose bei einer Reaktionstemperatur von 70°C innerhalb von 4 bis 5 Stunden und einem Estereinsatz von 16–20 mMol/Gramm Träger erzielt (DD 219490, 8.3. 1985) erreicht. Die Übertragung von Oxycarbonylgruppen auf Aminogruppen von Aminosäuren und Peptiden durch Reaktion mit Chlorameisensäureestern wie tert.-Butoxycarbonylchlorid (Boc-Cl) ist eine in der Peptidchemie häufig angewandte Reaktion zur Einführung von Schutzgruppen. Anstelle der Chlorameisensäureester werden auch symmetrische oder unsymmetrische Kohlensäureester oder ein salzartiges Addukt aus Chlorameisensäureester und Dimethylaminopyridin (DMAP) (Guibé-Jampel, Chem. Commun. 1971 267) für die Übertragung von Oxycarbonylgruppen auf die Aminogruppen von Aminosäuren und Peptiden eingesetzt.



Die Eignung des stabilen Tetrafluoroborats DMAP<sup>4+</sup> · CNBF<sub>4</sub><sup>-</sup> zur Übertragung der Cyanogruppe auf die Hydroxylgruppen von Polymeren unter Bildung von Cyanaten wurde von Wilchek et al. (Meth. Enzymol. 104 (1984) 3–55) beschrieben. Die Reaktion führt bei der Umsetzung von Sepharose zu Trägern hoher Kopplungskapazität (bis zu 70 μMol Cyanat/g abgesaugte Sepharose 4B). Die Reaktion von Chlorameisensäureestern mit Trisacryl wird nach Angaben von Miron und Wilchek (6th Internat. Symp. Bioaffinity Chromat. and Related Techniques, Prague, 1985) durch Dimethylaminopyridin katalysiert. Die bisher bekannten Synthesen von Polymeren des Kohlensäurediestertyps f-O-CO-OR gehen von Chlorameisensäureestern oder symmetrischen Carbonaten (Wilchek, Miron, Appl. Biochem. Biotechnol. 11 (1985) 3, 191; Henklein et al. Patentschrift DD 219490 (8.3. 1985)) aus. Der Nachteil dieser Verfahren besteht in der aufwendigen Synthese der Chlorameisensäure- oder Kohlensäurediester und den relativ geringen Umsatzraten zu aktivierten Trägern. So erfordert z. B. die Einführung von 1 bis 2 mMol Oxycarbonylgruppen pro Gramm Cellulose etwa den 10fachen Überschuss an Chlorameisensäureester (Drobnič et al., Biotechnol. Bioeng. 24 (1982) 487) und erhöhte Temperaturen (65°C) bzw. bei Raumtemperatur lange Reaktionszeiten.

### Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, symmetrische Kohlensäurediester für die Aktivierung von hydroxylgruppenhaltigen Polymeren und daraus gebildeten Festkörperoberflächen (Matrices) durch Einführung von Oxcarbonylgruppen (-CO-OR) bei milden Reaktionsbedingungen einzusetzen und die dafür benötigten Kohlensäurediester-Mengen bei Erreichung hoher Aktivierungsgrade möglichst gering zu halten.

### Derlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die Reaktivität symmetrischer Kohlensäurediester gegenüber hydroxylgruppenhaltigen Polymeren stark zu erhöhen.

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß symmetrische Kohlensäurediester der allgemeinen Formel RO-CO-OR, wobei der Rest R eine elektronenanziehende Gruppe darstellt, in Gegenwart von zur Bildung von reaktiven Acyllumsalzen befähigten supernucleophilen Aminen im Verhältnis von 0,01 bis 2,5 Mol Amin pro Mol Kohlensäurediester und gegebenenfalls einem weiteren der Gruppe starker Basen zugehörigen tertiären Amin im Verhältnis 0,1 bis 2,5 Mol Amin pro Mol Kohlensäurediester bzw. den daraus gebildeten Festkörperoberflächen umgesetzt werden. Dabei ist es auch möglich, diese symmetrischen Kohlensäurediester intermediär zu bilden, z.B. aus den entsprechenden Chlorameisensäureestern, gegebenenfalls aus Phosgen gemeinsam mit einem Phenol oder einem N-substituierten Hydroxylamin.

Als hydroxylgruppenhaltige Polymere sind sowohl wasserlösliche als auch unlösliche natürliche Polysaccharide und deren Derivate oder Hydrolyseprodukte wie Cellulose, Agarose, Dextran, Stärke, Mannan, Sepharose, Stärkhydrolyseprodukte (SHP) u.a. oder synthetische Polymere wie Polyvinylsterivate (Fractogel, Toyopearl), Vinylalkohol/Acrylnitril-Mischpolymerate, Spheron, Trisacryl, Polyvinylalkohol, Polyethylenglykol usw. in einer oder allen erfindungsgem. 3ßen Varianten der Aktivierung mit Kohlensäurediestern einsetzbar. Dabei können die Polymeren als solche oder in Form daraus hergestellter Produkte wie Formkörper (Perlen), Fasern, Gewebe, Folien oder Papier zur Reaktion gebracht werden.

Die Reaktion von symmetrischen Kohlensäurediestern des Typs RO-CO-OR mit R = Succinimidyl-, Phthalimidyl-, 5-Norbornen-2,3-dicarboximidyl-, o- und p-Nitrophenyl- oder anderen substituierten Phenylresten kann in organischen Lösungsmitteln wie Dimethylsulfoxid, Acetonitril, Tetrahydrofuran, Aceton, Pyridin oder aromatischen Kohlenwasserstoffen wie Benzen und Toluol u.a. oder aliphatischen Verbindungen wie Hexan u.a. halogenierten Kohlenwasserstoffen wie Methylchlorid, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff u.a. durchgeführt werden. Dabei erfolgt im allgemeinen aber nur eine geringfügige Substitution der Hydroxylgruppen durch -CO-OR, wenn hohe Reaktionstemperaturen bzw. lange Reaktionszeiten angewendet werden, wie am Beispiel der Reaktion des N,N'-Bis-(5-norbornen-2,3-succinimidyl)-carbonate in Tabelle 1 gezeigt wird.

Durch Zusatz von tertiären Aminen wie Triethylamin, Pyridin, N,N-Dimethylanilin, N-Methylmorpholin u.a. ist die Umsetzung der Kohlensäurediester mit den hydroxylgruppenhaltigen Polymeren nicht oder nur unwesentlich zu beschleunigen (Tab. 1). Dagegen wird eine starke Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit und des erreichbaren Substitutionsgrades bei Einwirkung von supernucleophilen Aminen wie 4-Dimethylaminopyridin (DMAP), 4-Pyridinopyridin (PPY), N-Methylimidazol, Diazabicyclo[5.4.0]undecen (DBU), 4-Morpholinopyridin, Diazabicyclo[2.2.2]octan u.a. in einem Verhältnis von 0,01 bis 2,5 Mol Amin/Mol Carbonat erzielt (Tab. 1 und Tab. 2).

Die durch das supernucleophile Amin DMAP vermittelte Reaktion wird durch die gleichzeitige Anwesenheit starker Basen wie Triethylamin, N,N-Dimethylanilin usw. nicht beeinflußt (Tabelle 1). Da auch die supernucleophilen Amine in sehr kleinen Mengen nur geringe Wirksamkeit haben, liegt keine echte katalytische Wirkung der Amine vor (Tabelle 3).

Das optimale molare Verhältnis von symmetrischem Kohlensäurediester zu nucleophilem Amin im Hinblick auf die Erzielung einer hohen Kopplungskapazität liegt bei 1,0 bis 5,0.

Die Beschleunigung der Reaktion von symmetrischen Kohlensäurediestern mit OH-gruppenhaltigen Polymeren in Gegenwart supernucleophiler Amine ermöglicht die Durchführung der Reaktion bei Raumtemperatur innerhalb von 10 bis 30 Minuten. Nur bei besonders wenig reaktionsfähigen Polymeren ist eine Temperaturerhöhung bis zu etwa 60°C erforderlich. Auch bei Herabsetzung der Reaktionstemperatur auf 4°C ist die Umsetzung bei reaktionsfähigen Polymeren wie Sepharose und Cellulose schon nach 10 Minuten abgeschlossen.

Lösungsmittel wie Dioxan, Aceton, Acetonitril, Chloroform u.a. sind für die Erzielung hoher Kopplungskapazitäten besonders gut geeignet (Tab. 4), jedoch ist die Durchführung der Reaktion auch in beliebigen anderen wasserfreien Lösungsmitteln möglich. Alkohole oder andere hydroxylgruppenhaltige Lösungsmittel sind ungeeignet bzw. führen zu niedrigen Kopplungskapazitäten. Die Anwendungsbreite der Methode wird aus Tab. 5 ersichtlich, in der die Ergebnisse der Aktivierung unterschiedlicher hydroxylgruppenhaltiger Polymere dargestellt sind. Sowohl natürliche Polysaccharide und deren Derivate (Sephadex, Sepharose) als auch synthetische Trägermaterialien (Fractogel) oder lösliche Polymere wie Polyethylenglycol sind der Zugänglich.

Die Synthese und Reinherstellung der für die Polymeraktivierung eingesetzten symmetrischen Kohlensäurediester kann auf einfache Weise umgangen werden, denn eine große Zahl von Chlorameisensäureestern reagiert in Gegenwart tertiärer Amine wie Triethylamin, N-Methylmorpholin, N,N-Dimethylanilin, Pyridin, Dimethylaminopyridin u.a. zu symmetrischen Kohlensäurediestern.

Diese glatt ablaufende Reaktion bietet die Möglichkeit der Aktivierung hydroxylgruppenhaltiger Polymere durch Umsetzung mit Chlorameisensäureestern, einem tertiären Amin und einem der supernucleophilen Amine, die für die Umsetzung von symmetrischen Kohlensäurediestern mit hydroxylgruppentragenden Verbindungen geeignet sind (Tab. 7). Es erweist sich als zweckmäßig, einen geringen molaren Überschuß an carbonatbildendem tertiärem Amin im Verhältnis zum Chlorameisensäureester einzusetzen. Das supernucleophile Amin kann in einem Verhältnis von 0,01 bis 1 Mol pro Mol Chlorameisensäureester variiert werden, wobei höherer Aminenatz eine deutliche Steigerung der Kopplungskapazität bewirkt (Tabelle 8).

Auch die Erhöhung des Chlorameisensäureestereinsatzes bewirkt eine Zunahme der Kopplungskapazität, wie aus Tabelle 9 ersichtlich wird. Wie bei der Reaktion der Kohlensäureester beobachtet, ist beim Einsatz der supernucleophilen Amine die Reaktion bei Temperaturen von 4 bis 25°C innerhalb von 20 bis 30 Minuten beendet. Nur wenig reaktionsfähige Polymere erfordern höhere Temperaturen (bis 60°C) und Reaktionszeiten von 1 bis 2 Stunden. Die Aktivierung mittels Chlorameisensäureester ist auf unterschiedliche Gruppen hydroxylgruppenhaltiger Polymere anwendbar (s. Tab. 10). Die Eignung verschiedener, supernucleophiler Amine zur Erzielung hoher bis sehr hoher Kopplungskapazitäten wird durch die Ergebnisse in Tabelle 11 gezeigt. Wird die Umsetzung von Chlorameisensäureestern mit hydroxylgruppenhaltigen Trägern ausschließlich mit einem supernucleophilen Amin wie Dimethylaminopyridin, durchgeführt, wird bei den oben beschriebenen geringen Amineninsätzen von 0,01 bis 0,05 Mol pro Mol Chlorameisensäureester bei Raumtemperatur nur eine sehr geringe Steigerung gegenüber der Reaktion ohne Zusatz dieser Amine verzeichnet (Tab. 7). Wird das supernucleophile Amin jedoch in einem molaren Überschuß gegenüber dem Chlorameisensäureester eingesetzt, läuft die Reaktion in gleicher Weise wie in Gegenwart anderer stark basischer carbonatbildender tert. Amine mit geringer Nucleophilie mit dem hydroxylgruppenhaltigen Polymer bewirkt. Für die Aktivierungsreaktion mit Chlorameisensäureestern sind die gleichen wasserfreien Lösungsmittel verwendbar, die für die Reaktion von symmetrischen Kohlensäureestern mit hydroxylgruppenhaltigen Polymeren Anwendung finden. In Kenntnis der Bildung von Chlorameisensäureestern aus Phenolen bzw. substituierten Hydroxylaminen – durch Reaktion mit Phosgen in Gegenwart von tertiären Aminen wie Triethylamin, N,N-Dimethylamin, N-Methylmorpholin u.a. ist es ebenso gut möglich, die oben geschilderte Aktivierung von hydroxylgruppenhaltigen Polymeren auch unter Umgehung der Chlorameisensäureesterisolierung durchzuführen. Dazu wird ein Gemisch aus dem hydroxylgruppenhaltigen Polymer, supernucleophilem Amin, und gegebenenfalls einem weiteren tertiären Amin und einem substituierten Phenol oder N-substituierten Hydroxylamin mit Phosgen umgesetzt. Durch die Wirkung der Kombination dieser Amine wird sehr schnell eine Reaktionskette mit der intermediären Bildung von Chlorameisensäureester und symmetrischen Kohlensäureestern durchlaufen, der seinerseits mit Hilfe des supernucleophilen Amins die Übertragung der Oxy carbonylgruppe auf das Polymer bewirkt. Diese Reaktionsführung hat den Vorteil, billige, kommerziell erhältliche Ausgangsstoffe für die Einführung von Oxy carbonylgruppen in hydroxylgruppenhaltige Matrices unter sehr schonenden Reaktionsbedingungen zu verwenden. Der ökonomische Vorteil dieser Verfahrensweise besteht darüber hinaus darin, daß die bei der Synthese von Chlorameisensäureester oder Kohlensäureestern auftretenden Ausbeuteverluste vermieden werden, und die billigen Ausgangsprodukte Phosgen und Phenole oder substituierte Hydroxylamine in hoher Ausbeute als Oxy carbonylgruppe in die Matrix eingeführt werden. Tabelle 12 zeigt die Ergebnisse der Aktivierung von Pericellulose in Abhängigkeit von den eingesetzten Mengen an Phosgen- und N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboximid. Die Einführung unterschiedlicher Abgangsgruppen in Cellulosecarbonate vom Typ Cell-CO-OR (R = N-Hydroxysuccinimidyl-, p-Nitrophenyl-, N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboximidyl-) durch Reaktion von Phosgen und den entsprechenden Hydroxylverbindungen (Phenol, bzw. N-substituiertes Hydroxylamin) kann als allgemein anwendbare Reaktion zur Aktivierung von hydroxylgruppenhaltigen Polymeren angesehen werden (Tab. 13). Das Ziel der Erfindung, ein einfaches und ökonomisches Verfahren zur Übertragung von Oxy carbonylgruppen auf hydroxylgruppenhaltige Matrices mittels symmetrischer Kohlensäureester, ist im wesentlichen durch das folgende erfindungsgemäß Merkmal erreicht worden: Die reaktionsbeschleunigende Wirkung von supernucleophilen Amine auf die Aktivierung von hydroxylgruppenhaltigen Matrices durch Übertragung von Oxy carbonylgruppen aus symmetrischen Kohlensäureestern und deren Bildung aus Chlorameisensäureestern durch Einwirkung von tertiären Aminen wie z.B. Triethylamin usw. Die Kombination von carbonatbildenden Basen und supernucleophilen Amine ermöglicht den Einsatz von Phosgen und N-substituierten Hydroxylaminen bzw. Phenol oder von Chlorameisensäureestern als Mittel zur Übertragung von Oxy carbonylgruppen anstelle der meist schwerer zugänglichen symmetrischen Carbonate. Im Vergleich zur direkten Umsetzung von Chlorameisensäureestern oder symmetrischen Kohlensäureestern gestaltet der Einsatz der supernucleophilen Amine eine Herabsetzung der Reaktionstemperatur auf 4 bis 25°C und eine Verkürzung der Reaktionszeit auf 10 bis 20 Minuten. Bei Temperaturen von 50 bis 60°C werden auch wenig reaktionsfähige Polymere in hohem Maße aktiviert. Die milden Reaktionsbedingungen gestalten auch die Aktivierung von wenig strukturstabilen Polymeren wie Sepharosen oder Polymerfilmen. Der im Vergleich zu bekannten Verfahren hohe Umsatz der Reagenzien (bis zu 80–90%) und der Einsatz billiger Rohstoffe bewirkt eine wesentlich verbesserte Ökonomie des erfindungsgemäß Verfahrens zur Aktivierung von hydroxylgruppenhaltigen Matrices. Die Anwendung der erfindungsgemäß hergestellten, aktivierte Matrices wurde am Beispiel der Kopplung von Aminen wie aliphatischen Diaminen oder Polyaminen von Proteinen wie Concanavalin A, Ovomucoid, Ovoinhibitor u.a. sowie Enzymen wie Glucoseoxidase, Meerrettichperoxidase und Trypsin oder Immunoglobuline und Antikörper sowie ihren Einsatz als Affinitätsadsorbens oderträgerfixiertes Enzym überprüft. Die Kopplung von Nucleinsäuren an feste Träger wie Cellulose, Sepharose, Fractogel usw. ergibt Affinitätsräger, die zur Reinigung von DNA- und RNA-Polymerasen, Kinasen, Nucleasen usw. geeignet sind. Bei der Reaktion der aktivierte Träger mit SH-gruppenhaltigen Verbindungen entstehen in glatter Reaktion Thiokohlensäure-O,S-diester, wie am Beispiel der Reaktion von aktivierte Pericellulose mit Thiokalkanol und Thiophenol gezeigt werden konnte.

#### Ausführungsbeispiele

Die erfindungsgemäße Herstellung von aktivierten Matrices und deren Reaktion mit nucleophilen Reaktionspartnern soll anhand folgender Beispiele erläutert werden:

##### Beispiel 1

Pericellulose wird durch Behandlung mit Wasser-Aceton-Gemischen steigenden Acetongehalts und wasserfreiem Aceton entwässert. Ein Volumen wasserfreier Pericellulose wird in einem Volumen Aceton aufgenommen, in dem 40 µMol Dimethylaminopyridin gelöst wurden. Unter leichtem Schütteln wird portionsweise ein Milliliter einer Acetonlösung von N,N'-Bis(5-norbornen-2,3-dicarboximidyl)-carbonat (CO(ONB)<sub>2</sub>) (80 µMol/ml) hinzugegeben. Die Umsetzung erfolgt bei Raumtemperatur und wird 10 Minuten nach Beendigung der Carbonatzugabe durch Absaugen der überstehenden Lösung über eine Glasfritte und gründliches Waschen mit Aceton abgebrochen. Der aktivierte Träger enthält 860 µMol Carbonatgruppen pro Gramm wasserfreier Cellulose.

Die Bestimmung der Kopplungskapazität erfolgt durch Hydrolyse des aktivierten Trägers mit 0,1 N NH<sub>4</sub>OH und spektralphotometrische Bestimmung des abgespaltenen N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboximids (HONB) bei 270 nm ( $\epsilon = 6,4 \cdot 10^3 \text{ Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

##### Beispiel 2-7

Pericellulose wurde analog Beispiel 1 aktiviert, s. Tab. 1, Versuch Nr. 9, 11-15.

##### Beispiel 8-11

Pericellulose wurde analog Beispiel 1 aktiviert, s. Tab. 2, Versuch Nr. 1-4.

##### Beispiel 12-14

Die Aktivierung wurde gemäß Beispiel 1 durchgeführt, s. Tab. 3, Versuch Nr. 1-3.

##### Beispiel 15

Pericellulose wird wie in Beispiel 1 beschrieben entwässert. Ein Volumen wasserfreier Pericellulose wird durch Waschen mit Acetonitril von anhaftendem Aceton befreit und mit einem Volumen Acetonitril, das 40 µMol/ml Dimethylaminopyridin enthält, versetzt. Die Umsetzung mit 40 µMol CO(ONB)<sub>2</sub>/ml Cellulose wird unter leichtem Schütteln innerhalb von 20 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Abtrennen des Überstandes und Waschen des Trägers mit Acetonitril wird zur Ermittlung der Kopplungskapazität wie folgt verfahren: eine Probe des aktivierten Trägers wird stufenweise mit Aceton-Wassergemischen steigenden Wassergehalts und Wasser behandelt, mit Boratpuffer, pH 8,1, equilibriert und mit Glycin zur Reaktion gebracht. Die Ermittlung des Anteils an kovalent gebundener Aminosäure wird nach Antoni et al. (Analyst. Biochem. 129 (1983) 60-63) durch Rücktitration des nichtumgesetzten Glycins mit Trinitrobenzolsulfonsäure ermittelt.  
Kopplungskapazität: 515 µMol Glycin/g trockene Sepharose.

##### Beispiel 16 bis 17

Entsprechend dem Beispiel 15 wurde die Aktivierungsreaktion mit den in Tabelle 4, Versuch Nr. 3 und 4, aufgeführten Lösungsmitteln vorgenommen.

##### Beispiel 18

Sepharose Cl-4B wird stufenweise mit Wasser-Aceton-Gemischen steigenden Acetongehalts und wasserfreiem Aceton entwässert. Ein Volumen wasserfreier Sepharose Cl-4B wird mit einem Volumen Aceton versetzt, in dem 46 µMol Dimethylaminopyridin und 43 µMol Triethylamin pro Milliliter Träger gelöst wurden. Unter Kühlung auf 15°C und leichtem Schütteln wird 1 Volumen einer acetonischen Lösung von CO(ONB)<sub>2</sub> (80 µMol/ml Sepharose) in kleinen Portionen hinzugegeben, so daß die Temperatur des Reaktionsgemisches nicht über 24°C ansteigt. Nach einer Reaktionszeit von 10 Minuten wird der Träger von der überstehenden Lösung abgetrennt und mit Aceton gründlich gewaschen. Zur Ermittlung der Kopplungskapazität wird wie im Beispiel 16 verfahren.  
Kopplungskapazität: etwa 515 µMol Glycin/g trockene Sepharose. Die durch HONB-Abspaltung bestimmte Kopplungskapazität beträgt 640 µMol/g trockene Sepharose.

##### Beispiel 19-21

Die in Tab. 5 aufgeführten Polymere wurden analog Beispiel 1 aktiviert, s. Versuch Nr. 7, 9 und 10.

##### Beispiel 22

Die Aktivierung von Polyethylenglykol 1500 wird durch Zugabe von 30,4 mg CO(ONB)<sub>2</sub> zu einer Lösung von 1 g PEG 1500 und 4,4 mg DMAP in 3 ml Aceton bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach einer Reaktionszeit von 25 Minuten wird das PEG 1500 mit Äther ausgefällt. Der Carbonatgehalt des Produktes beträgt 213 µMol/g.

##### Beispiel 23-25

Die Aktivierung von Pericellulose wurde analog Beispiel 1 unter Einsatz verschiedener Carbonate durchgeführt, s. Tab. 6, Versuch Nr. 1-3.

**Beispiel 28**

Pericellulose wird in der in Beispiel 1 beschriebenen Weise entwässert und in wasserfreiem Dioxan aufgenommen. Zu einem Volumen wasserfreier Cellulose wird ein Volumen Dioxan hinzugefügt, in welchem 2,6 mMol Triethylamin und 0,2 mMol Dimethylaminopyridin pro Gramm trockener Cellulose gelöst sind. Bei Raumtemperatur erfolgt unter leichtem Schütteln die portionsweise Zugabe von 2,1 mMol N-(Chlorcarbonyloxy)-5-norbornen-2,3-dicarboximid (Cl-COONB), gelöst in einem Volumen wasserfreiem Dioxans. Nach 20 Minuten ist die Reaktion beendet, die überstehende Flüssigkeit wird von der Cellulose abgesaugt und der aktivierte Träger ausgelaufen mit Dioxan gewaschen. Der Substitutionsgrad der aktivierten Cellulose beträgt 400 µMol Carbonat pro Gramm trockene Cellulose.

**Beispiel 27-31**

Entsprechend Beispiel 26 wurde die Aktivierung von Pericellulose vorgenommen, s. Tab. 7, Versuch Nr. 3-7.

**Beispiel 32-34**

Die Aktivierung von Pericellulose wurde, wie unter Beispiel 26 beschrieben, durchgeführt, s. Tab. 8, Versuch Nr. 2-4.

**Beispiel 35-37**

Aktivierungen mit unterschiedlichem Chlorameisensäureester-Einsatz wurden analog Beispiel 28 durchgeführt, s. Tab. 9, Versuch Nr. 1-3.

**Beispiel 38-44**

Die Aktivierung verschiedener Polymere wurde entsprechend Beispiel 26 vorgenommen, s. Tab. 10, Versuch Nr. 2, 3, 5-9.

**Beispiel 45 und 46**

Die Aktivierung wasserlöslicher Polymere, die in Aceton oder Dioxan unlöslich sind, wird analog Beispiel 26 durchgeführt, wobei sich die Anwendung von Pyridin anstelle von DMAP als vorteilhaft erweist, s. Tab. 10, Versuch Nr. 10 und 12.

**Beispiel 47**

1 g Polyethylenglykol 1500 (Farak) wird in 2 ml trockenem Aceton gelöst und 10 mg DMAP und 150 µl Triethylamin hinzugegeben. In diese Lösung werden unter ständigem Schütteln bei Raumtemperatur innerhalb von 10 Minuten 200 mg (830 µMol) Cl-CO-ONB, gelöst in 2 ml Aceton, eingetropft. Nach einer Reaktionszeit von 10 Minuten wird die Reaktion durch Zugabe von Diethylether und Ausfällen des PEG beendet. Das aus Aceton umkristallisierte Produkt enthält 444 µMol Carbonatgruppen pro Gramm Trockensubstanz, s. Tab. 10, Versuch 11.

**Beispiel 48**

3 ml eines synthetischen hydroxylgruppenhaltigen Polymers (partikuläres Mischpolymerat aus Acrylnitril und Vinylalkohol) werden in 3 ml wasserfreiem Pyridin, dem 4,5 mg Dimethylaminopyridin zugesetzt wurden, eine Stunde bei 50 °C unter Schütteln mit 300 mg N-(Chlorcarbonyloxy)-5-norbornen-2,3-dicarboximid umgesetzt. Nach Abtrennen des Überstandes, Waschen mit Aceton und Entfernen des Acetons im Vakuum erhält man den aktivierte Träger in wasserfreier Form. Durch Hydrolyse in wässriger Ammoniaklösung und spektralphotometrische Bestimmung des freigesetzten HONB wurde die Kopplungskapazität zu 94 µMol-COONB/Gramm Trockensubstanz ermittelt.

**Beispiel 49**

Pericellulose wird, wie in Beispiel 1 beschrieben, entwässert und in wasserfreiem Aceton aufgenommen. Ein Volumen sedimentierte Cellulose wird mit 1 Volumen Aceton, in dem 40 µMol N-Methylimidazol/ml enthalten sind, und 217 µMol Triethylamin/ml versetzt und bei Raumtemperatur portionsweise 2,1 mMol/ml Chlorameisensäureester (Cl-CO-ONB), gelöst in einem Volumen Aceton, versetzt. Zehn Minuten nach Beendigung der Reagenzzugabe bei Raumtemperatur wird die Reaktion durch Abtrennung des Überstandes gestoppt. Die Cellulose wird auf der Fritte mit trockenem Aceton gewaschen, dann stufenweise in die wässrige Phase überführt und die Kopplungskapazität durch hydrolytische Abspaltung und spektralphotometrische Bestimmung von HONB ermittelt. Ergebnis: 607 µMol-CO-ONB pro Gramm trockene Pericellulose.

**Beispiel 50-62**

In gleicher Weise wie unter Beispiel 49 beschrieben, wurde die Eignung weiterer suprareaktiver Amine für die Aktivierung von hydroxylgruppenhaltigen Polymeren getestet, s. Tab. 11, Versuch Nr. 1, 3 und 4.

**Beispiel 53**

Pericellulose wird, wie in Beispiel 1 angegeben, entwässert und in wasserfreiem Aceton aufgenommen und zur vollständigen Entfernung des Acetons gründlich mit wasserfreiem Acetonitril gewaschen. Ein Volumen sedimentierte Pericellulose wird in zwei Volumina Acetonitril suspendiert, worin 36 µMol Dimethylaminopyridin, 320 µMol Triethylamin, 180 µMol N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboximid (HONB) pro Milliliter Cellulose gelöst sind. Durch portionsweise Zugabe einer 10%igen Phosgenlösung in Toluol wird mit insgesamt 160 µMol Phosgen pro Milliliter Cellulose bei Raumtemperatur umgesetzt. Nach Beendigung der Phosgenzugabe wird weitere 10 Minuten geschüttelt und die Reaktion durch Absaugen des Überstandes über eine Fritte und Waschen mit wasserfreiem Acetonitril beendet. Ein Teil der aktivierte Cellulose wird unmittelbar mit einer Lösung von Hexamethylendiamin in Acetonitril umgesetzt und der Gehalt an freien Aminogruppen des Trägers nach Antoni et al. (Anal. Biochem. 129 [1983] 60-63) ermittelt.

Ergbnis:  $46 \mu\text{Mol NH}_2$ -Gruppen/Gramm trockene Pericellulose. Ein weiterer Teil der aktivierte Cellulose wurde stufenweise ins Gramm trockene Cellulose bestimmt.  
Durch Kopplung von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Glycin wurde eine Bindung von  $225 \mu\text{Mol Glycin pro Gramm trockene Cellulose bestimmt.}$

**Beispiel 54-56**

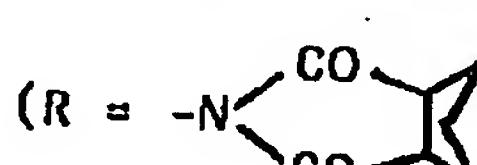
Entsprechend Beispiel 50 wurde Pericellulose aktiviert, s. Tab. 12, Versuch Nr. 2-4.

**Beispiel 57 und 58**

Analog der in Beispiel 50 beschriebenen Weise wurde die Eignung weiterer Phenoxy bzw. N-substituierter Hydroxylamine für die Aktivierung hydroxylgruppenhaltiger Träger gezeigt, s. Tab. 13, Versuch Nr. 1 und 2.

**Tabelle 1**

Umsetzung von Pericellulose mit symmetrischem Carbonat  $\text{RO-CO-CO-R}$



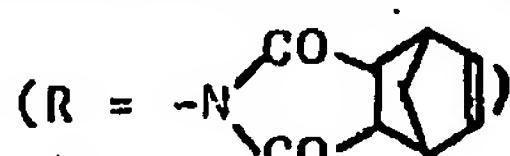
in Aceton (Raumtemperatur, Reaktionszeit: 10 Minuten)

Nr.	Carbonat ( $\mu\text{Mol/ml}$ sediment. Cellulose)	TEA ( $\mu\text{Mol/ml}$ sediment. Cellulose)	DMAP ( $\mu\text{Mol/ml}$ sediment. Cellulose)	Pyridin ( $\mu\text{Mol/ml}$ sediment. Cellulose)	Kopplungskapazität ( $\mu\text{Mol-COOR/g}$ trockene Cellulose)
1	80*	—	—	—	74
2	80	—	—	—	—
3	80	40	—	—	—
4	80	160	—	—	—
5	80	66700	—	—	—
6	80	—	—	—	—
7	80	—	—	40	—
8	80	—	—	160	—
				9000	—
9	80	—	12	—	—
10	80	—	40	—	370
11	80	—	80	—	850-900 805
12	80	43	6	—	108
13	80	43	12	—	488
14	80	43	24	—	720
15	80	43	48	—	780

\* Reaktionstemperatur: 70°C, 5,5 Stunden

**Tabelle 2**

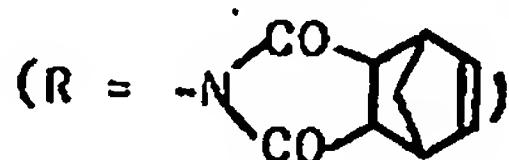
Reaktion von symmetrischem Kohlensäurediester  $\text{RO-CO-CO-R}$



mit Pericellulose unter Einsatz verschiedener suprenucleophiler Amine.  
(Raumtemperatur, Reaktionszeit: 20 Minuten,  $80 \mu\text{Mol}$  symmetrischer Kohlensäurediester/ml sedimentierte Cellulose,  $40 \mu\text{Mol}$  suprenucleophiles Amin/ml sedimentierter Cellulose, Lösungsmittel: Aceton)

Nr.	suprenucleophiles Amin	Kopplungskapazität ( $\mu\text{Mol-COOR/g}$ trockene Cellulose)
1	Dimethylaminopyridin	880
2	Methylimidazol	210
3	Diazabicyclo[2.2.2]octan	130
4	Diazabicyclo[5.4.0]undecen	50

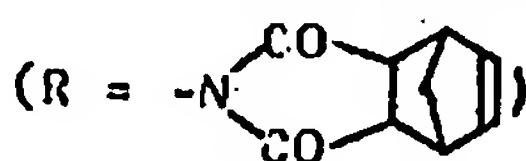
**Tabelle 3**  
Reaktion von symmetrischem Kohlensäurediester RO-CO-OR



mit Pericellulose in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an supernucleophilem Amin (Dimethylaminopyridin)  
(Reaktionszeit: 20 Minuten, Raumtemperatur, Lösungsmittel: Aceton)

Nr.	Kohlensäurediester ( $\mu\text{Mol}/\text{ml sedimentierte Cellulose}$ )	DMAP ( $\mu\text{Mol}/\text{ml sedimentierte Cellulose}$ )	Kopplungskapazität ( $\mu\text{Mol-COOR/g trockene Cellulose}$ )
1	80	12	370
2	80	40	930
3	80	80	805

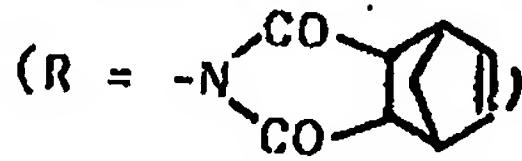
**Tabelle 4**  
Reaktion von symmetrischem Kohlensäurediester RO-CO-OR



mit Pericellulose in verschiedenen Lösungsmitteln (Reaktionszeit: 20 Minuten, Raumtemperatur, 80  $\mu\text{Mol}$  Kohlensäurediester/ml sedimentierte Cellulose, 40  $\mu\text{Mol}$  DMAP/ml sedimentierte Cellulose)

Nr.	Lösungsmittel	Kopplungskapazität ( $\mu\text{Mol-COOR/g trockene Cellulose}$ )
1	Aceton	805-930
2	Acetonitril	515
3	Dioxan	733
4	Chloroform	217

**Tabelle 5**  
Aktivierung verschiedener hydroxylgruppenhaltiger Polymere mit symmetrischem Kohlensäurediester RO-CO-OR

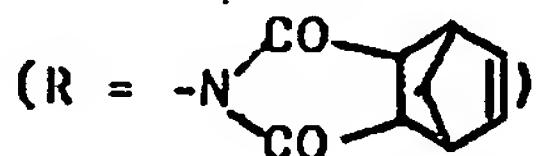


Nr.	Matrix	Kopplungskapazität ( $\mu\text{Mol-COOR/g trockenes Polymer}$ )
6	Pericellulose (makroporös)	800-900
7	Pericellulose (mikroporös)	68
8	Sephadex G-4B	640
9	Sephadex G-100	5
10	Fractogel TSK HW 76 (F)	88
11	Poly(ethylene glycol) 1500	213

**Tabelle 6**  
Aktivierung von Pericellulose mit verschiedenen symmetrischen Carbonaten  
(Raumtemperatur, Reaktionszeit: 20 Minuten, Lösungsmittel: Aceton, 80  $\mu\text{Mol}$  symm. Carbonat/ml sedimentierte Cellulose, 40  $\mu\text{Mol}$  DMAP/ml sedimentierte Cellulose)

Nr.	symm. Carbonat	Kopplungskapazität ( $\mu\text{Mol-COOR/g trockene Cellulose}$ )
1	$\text{N,N}'\text{-Disuccinimidyl-}$	882
2	$\text{N,N}'\text{-Diphthalimidyl-}$	106
3	$\text{p-NO}_2\text{-Phenyl-}$	570

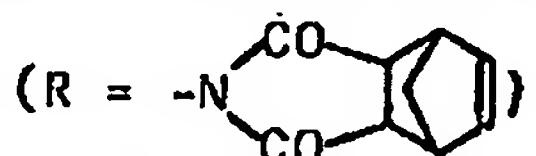
Tabelle 7  
Reaktion von Chlorameisensäureestern Cl-CO-OR



mit Pericellulose  
(Raumtemperatur, Reaktionszeit: 20 Minuten, Lösungsmittel: Aceton)

Nr.	Chlorameisen-säureester (mMol/g trockene Cell.)	TEA (mMol/g tr. Cell.)	DMAP (μMol/g tr. Cell.)	Pyridin (μMol/g tr. Cell.)	Kopplungs-kapazität (μMol/g tr. Cell.)
1	2,1	—	—	—	35
2	2,1	3,0	—	—	104
3	2,1	2,6	—	414	75
4	2,1	—	207	—	130
5	2,1	1,6	207	—	400
6	2,1	2,6	414	—	590
7	2,1	2,6	828	—	823

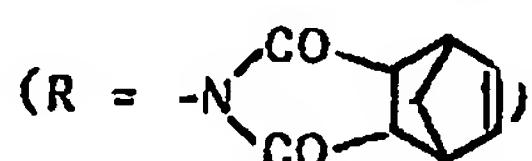
Tabelle 8  
Umsetzung von Pericellulose mit Chlorameisensäureester Cl-CO-OR



in Abhängigkeit der eingesetzten DMAP-Menge (2,1 mMol ClCOONB/g Cellulose, 2,6 mMol TEA/g Cellulose, Temperatur: 23°C, Reaktionszeit: 15 Minuten, Lösungsmittel: Aceton)

Nr.	DMAP (μMol/g trockene Cellulose)	Kopplungskapazität (μMol-COOR/g trockene Cellulose)
1	0	25
2	20,7	150
3	207	333
4	414	590

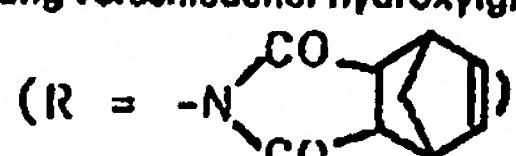
Tabelle 9  
Abhängigkeit der Reaktion von Chlorameisensäureester RO-CO-Cl



mit Pericellulose vom Estereinsatz (Temperatur: 5°C, Reaktionszeit: 20 Minuten, Lösungsmittel: Aceton)

Nr.	Chlorameisen-säureester (mMol/g trockene Cellulose)	TEA (mMol/g trockene Cellulose)	DMAP (mMol/g trockene Cellulose)	Kopplungs-kapazität (μMol-COOR/g trockene Cellulose)
1	2,1	2,6	0,2	422
2	4,2	5,2	0,2	522
3	8,4	10,4	0,2	778

Tabelle 10  
Aktivierung verschiedener hydroxylgruppenhaltiger Polymere mit Chlorameisensäureester Cl-CO-OR

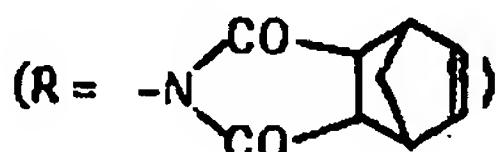


(Raumtemperatur, Reaktionszeit: 20 bis 60 Minuten, 2,1 mMol Chlorameisensäureester/g trockenen Träger, 210 μMol DMAP/g trockenen Träger, 2,7 mMol Triethylamin/g trockenen Träger, Lösungsmittel: Aceton oder Dioxan)

Nr.	Matrix	Kopplungskapazität ( $\mu\text{Mol-COOR/g trockener Träger}$ )
1	Pericellulose (makroporös)	820
2	Pericellulose (mikroporös)	50
3	Cellulosepulver MN 300	355
4	Sephadose CL-4B	1073*
5	Sephadex LH-20	444
6	Spherosil P 1000	452
7	Trisacryl G1 2000	50
8	Toyopearl HW-80	1365**
9	Fractogel TSK HW 75 (F)	780
10	Polyvinylalkohol	21***
11	Polyethylenglykol 1500	462*
12	SHP (Stärkehydrolysat)	44**

\* 2,6 mMol Cl-CO-OR; 3,6 mMol TEA; 600  $\mu\text{Mol DMAP}$   
 \*\* 2,7 mMol Cl-CO-OR; 3,5 mMol TEA; 275  $\mu\text{Mol DMAP}$   
 \*\*\* 2,1 mMol Cl-CO-OR; 2,7 mMol TEA; 1055  $\mu\text{Mol Pyridin}$   
 \* 0,83 mMol Cl-CO-OR; 1,0 mMol TEA; 80  $\mu\text{Mol DMAP}$   
 \*\* 2,1 mMol Cl-CO-OR; 2,7 mMol TEA; 210  $\mu\text{Mol Pyridin}$

Tabelle 11  
Reaktion von Chlorameisensäureester Cl-CO-OR



mit Pericellulose unter Einsatz verschiedener suprenucleophiler Amine  
(Raumtemperatur, Reaktionszeit: 20 Minuten, 2,1 mMol Chlorameisensäureester/g trockene Cellulose, 210  $\mu\text{Mol Amin/g}$  trockene Cellulose, 2,7 mMol Triethylamin/g trockene Cellulose, Lösungsmittel: Aceton)

Nr.	suprenucleophiles Amin	Kopplungskapazität ( $\mu\text{Mol-COOR/g trockene Cellulose}$ )
1	Dimethylaminopyridin	797
2	N-Methylimidazol	802
3	Diazabicyclo[2.2.2]octan	190
4	Diazabicyclo[5.4.0]undecen	200

Tabelle 12  
Aktivierung von Pericellulose durch Reaktion mit Phosgen und N-substituiertem Hydroxylamin HO-NR<sub>2</sub>



ir: Gegenwart von tertären Aminen  
(Raumtemperatur, Reaktionszeit: 20 Minuten, Lösungsmittel: Acetonitril)

Nr.	Phosgen ( $\mu\text{Mol}^*$ )	HONB ( $\mu\text{Mol}^*$ )	TEA ( $\mu\text{Mol}^*$ )	DMAP ( $\mu\text{Mol}^*$ )	Kopplungskapazität ( $\mu\text{Mol-COOR/g trockeneCellulose}$ )
1	160	160	320	36	362
2	48	320	320	36	62
3	320	320	640	72	310
4**	160	160	160	36	325

\* pro ml sedimentierter Cellulose\*\*

\*\* Lösungsmittel:  $\text{CHCl}_3$

Tabelle 13  
Aktivierung von Pericellulose durch Reaktion mit Phosgen und unterschiedlichen Phenolen bzw. N-substituierten  
Hydroxylaminen (Raumtemperatur, Reaktionszeit: 20 Minuten, Lösungsmittel: Acetonitril, 320  $\mu\text{Mol Triethylamin/ml}$   
sedimentierte Cellulose, 38  $\mu\text{Mol DMAP/ml}$  sedimentierte Cellulose, 160  $\mu\text{Mol Phosgen und 160 \mu Mol Phenol bzw.}$   
N-substituiertes Hydroxylamin/ml sedimentierte Cellulose)

Nr.	Phenol bzw. N-subst. Hydroxylamin	Kopplungskapazität ( $\mu$ Mol-COOR/g (trockene Cellulose))
1	N-Hydroxysuccinimid	330
2	p-Nitrophenol	105
3	N-Hydroxy-5-norbornen- 2,3-dicarboximid (HONB)	382

Bestimmung der Kopplungskapazität durch Hydrolyse der Träger mit Ammoniaklösung und spektralphotometrische Messung des freigesetzten Phenols oder der N-substituierten Hydroxylamine.